

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年1月31日 (31.01.2002)

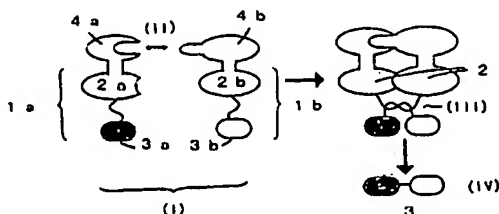
PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/08766 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/68, C12N 15/09 (UMEZAWA, Yoshio) [JP/JP]; 〒162-0063 東京都新宿区市ヶ谷薬王寺町45-1-203 Tokyo (JP). 小澤岳昌 (OZAWA, Takeaki) [JP/JP]; 〒270-2231 千葉県松戸市稔台617-18 Chiba (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/09348
- (22) 国際出願日: 2000年12月27日 (27.12.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2000-224939 2000年7月26日 (26.07.2000) JP
- (74) 代理人: 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CA, JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 梅澤晋夫
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROBE FOR ANALYZING PROTEIN-PROTEIN INTERACTION AND METHOD OF ANALYZING PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS WITH THE USE OF THE SAME

(54) 発明の名称: 蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ及びそれを利用した蛋白質-蛋白質相互作用の解析方法



(57) Abstract: To enable the provision of a probe for analyzing a protein-protein interaction, whereby protein-protein interactions of among any proteins can be highly accurately and conveniently analyzed, and the analysis of a protein-protein interaction with the use of this probe, a probe for analyzing an interaction between two proteins, whereby a protein splicing is induced by the protein-protein interaction and a physicochemically or biochemically detectable protein is thus regenerated, is provided.

[続葉有]

WO 02/08766 A1



(57) 要約:

あらゆる蛋白質について、高い精度で簡便に蛋白質-蛋白質相互作用を解析できる蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブと、それを用いた蛋白質-蛋白質相互作用の解析を可能とするために、二つの蛋白質間の相互作用を解析するためのプローブであって、蛋白質-蛋白質相互作用によりプロテインスプライシングを生じさせ、物理化学的または生化学的に検出可能な蛋白質を再生させる蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

明 細 書

蛋白質－蛋白質相互作用解析用プローブ及び
それを利用した蛋白質－蛋白質相互作用の解析方法

技術分野

この出願の発明は、蛋白質－蛋白質相互作用を解析するためのプローブと、それを用いた蛋白質－蛋白質相互作用の解析方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、あらゆる生細胞中の蛋白質－蛋白質間の相互作用を精度高く、簡便に解析できる蛋白質－蛋白質相互作用解析用プローブと、それを用いた蛋白質－蛋白質相互作用の解析方法に関するものである。

背景技術

生細胞の構築や機能においては、蛋白質－蛋白質相互作用が重要な役割を果たしていることが知られている。

また、遺伝子の転写機構や細胞内情報伝達などに代表される分子生物学や生物化学の様々な課題の多くは、蛋白質－蛋白質相互作用が関連するものである。

分子生物学や生物化学の分野におけるこれらの研究課題の一部は、これまでに、蛋白質ライブラリー中の「獲物」蛋白質と「おとり」蛋白質との相互作用によってスクリーニングされる two-hybrid 法 (Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., Fields, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 9578-9582; Fields, S., Song, O., *Nature* 1989, 340, 245-246) などの発展によって解明されてきた。この two-hybrid 法は、蛋白質－蛋白質相互作用の候補分子の同定を簡便にし、更に新たな蛋白質－蛋白質相互作用マップを作

成する有効な手段として提唱されたものである (Flores, A., Briand, J.F., Gadai, O., Andrau, J.C., Rubbi, L., Mullem, V., Boschiero, C., Gousset, M., Marck, C., Carles, C., Thuriaus, P., Sentenac, A., Werner, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96: 7815-7820; Ito, T., Tashiro, K., Muta, S., Ozawa, R., Chiba, T., Nishizawa, M., Yamamoto, K., Kuhara, S., Sakaki, Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 97, 1143-1147; Walhout, A.J.M., Sordella, R., Lu, X., Hartley, J. L., Temple, G.F., Brasch, M.A., Thierry-Mieg, N., Vidal, M., *Science* 2000, 287, 116-122)。しかし、この two-hybrid 法では、細胞核中、レポーター遺伝子の付近で起こる解析可能な蛋白質相互作用に限って適用できるものであり、一般性に欠けるという問題があった。

また、two-hybrid 法は、信頼性においても問題があり、分析の度にモデル細胞あるいは動物を用いて、機能が既知となっている蛋白質による確認試験を行う必要があった (Walhout, A. J. M. et al., *Science* 1999, 287, 116-122)。

そこで、新たな蛋白質-蛋白質相互作用の解析方法として、蛋白質との反応により N-および C-末端のユビキチンが再構成され、転写因子の開裂により細胞核付近にあるレポーターが活性化される スプリットユビキチン蛋白センサー (USPS) 法 (Dunnwald, M., Varshavsky, A., Johnsson, N., *Mol. Biol. Cell* 1999, 10, 329-344; Johnsson, N., Varshavsky, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 5187-5192; Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N., Heesen, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 5187-5192) や、蛋白質間の相互作用により、触媒ドメインと膜局在化ドメインが近づき、グアニン交換因子 (GEF) または Ras が再構成され、これがさ

らに温度敏感変異酵母 GEF を有する酵母を補完するという SOS-リクルートシステムが提案された (Aronheim, A., *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 3373-3374; Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S. J., Karin, M., *Mol. Cell. Biol.* 1997, 17, 3094-3102; Broder, Y. C., Katz, S., Aronheim, A., *Curr. Biol.* 1998, 8, 1121-1124)。

さらに、より一般性の高いアプローチとして、スプリット酵素法が報告された (Rossi, F., Charlton, C. A. and Blau, H. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 8405-8410; Remy, I., Michnick, S. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 5394-5399; Pelletier, J. N., Arndt, K. M., Pluckthun, A., Michnick, S. W., *Nature Biotech.* 1999, 17, 683-690)。この方法では、分割された酵素が蛋白質-蛋白質相互作用により再構築され、酵素活性が復旧される。このとき再構築された酵素の活性は、菌または細胞の表現型、あるいは蛍光性酵素基質によって測定できる。

これらの様々な方法は、比較的精度が高く、いずれも細胞内蛋白質や膜蛋白質の相互作用を検定する目的には適するが、適切に設計された細胞にのみ適用できる、十分な精度や感度が得られない等の問題があった。また、これらの方法は、いずれも、解析を行うために種々の基質を用いる必要があり、手間がかかるという問題もあった。

したがって、これまで、あらゆる蛋白質について、精度高く、かつ簡便に蛋白質-蛋白質相互作用を解析できる汎用性のある方法やプローブは全く知られていなかったのが実情である。

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、あらゆる蛋白質につい

て、高い精度で簡便に蛋白質-蛋白質相互作用を解析できる蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブと、それを用いた蛋白質-蛋白質相互作用の解析方法を提供することを課題としている。

発明の開示

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、まず第1には、二つの蛋白質間の相互作用を解析するためのプローブであって、蛋白質-蛋白質相互作用によりプロテインスプライシングを生じさせ、物理化学的または生化学的に検出可能な蛋白質を再生させることを特徴とする蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

第2には、この出願の発明は、intein のN-末端側のポリペプチドと標識蛋白のN-末端側のポリペプチドを含むプローブaと、intein のC-末端側のポリペプチドと標識蛋白のC-末端側のポリペプチドを含むプローブbの二つのプローブからなる蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

また、この出願の発明は、第3には、上記プローブaのC-末端側とプローブbのN-末端側に、各々リンカー配列を有する蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

さらに、この出願の発明は、第4には、intein が酵母VMA由来のエンドヌクレアーゼである蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを、第5には、intein が藍藻由来のDnaEである蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

第6には、この出願の発明は、前記の標識蛋白が蛍光蛋白である蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを、第7には、蛍光蛋白が緑色蛍光蛋白である蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを提供

する。

また、この出願の発明は、第 8 には、標識蛋白が発光触媒酵素である蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを、第 9 には、発光触媒酵素がルシフェラーゼである蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

さらに、この出願の発明は、第 10 には、前記第 2～第 9 のいずれかのプローブ a を連結した蛋白質と前記第 2～第 9 のいずれかのプローブ b を連結した蛋白質を共存させ、標識蛋白のシグナルを検出することを特徴とする蛋白質-蛋白質相互作用の解析方法を提供する。

そしてさらに、第 11 には、この出願の発明は、前記第 1～第 9 のいずれかの蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを発現するポリヌクレオチドを真核細胞内に導入することによりプローブ a を連結した蛋白質とプローブ b を連結した蛋白質を共存させる蛋白質-蛋白質相互作用の解析方法をも提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、この発明の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブの構成および作用原理を例示した概略模式図である。(I) は共存、(II) は蛋白質-蛋白質相互作用、(III) は蛋白質スプライシング、(IV) は標識蛋白連結を示す。さらに、(1 a) は蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ a、(1 b) は蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ b、(2 a) は intein の N-末端側のポリペプチド、(2 b) は intein の C-末端側のポリペプチド、(3) は標識蛋白を示し、とくに (3 a) は標識蛋白の N-末端側のポリペプチドを、(3 b) は標識蛋白の C-末端側のポリペプチドを示す。(4 a) は蛋白質

(または蛋白質部位) A、(4b) は蛋白質 (または蛋白質部位) B を示す。

図2は、この発明の実施例において、EGFPのN-末端側のポリペプチドの構造について、1124~1129の間で置換したアミノ酸残基を示した図である。

図3は、この発明の実施例において、大腸菌中で発現され、pGEX__NVCで変換された蛋白質のSDS-PAGE分析結果を示した図である。(a)~(c)は、それぞれ、Coomassie Blue 染色 SDS-PAGE、(a)は蛋白質分子量標準 (Novagen) と分子量 (kDa)、(b)はGST-アフィニティーカラム前の粗生成物、(c)はGST-アフィニティーカラムによる精製後を示す。また、(d)~(e)は溶解産物の粗生成物のウェスタンブロッティングを示し、(d)はVDE特異的抗体による分析結果、(e)はGFP特異的抗体による分析結果を示す。

図4は、この発明の実施例において作成されたプラスミド (蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ①) の構成を示した概略模式図である。帯上は制限酵素切断領域であり、破線はVDE intein のエンドヌクレアーゼドメイン、白帯はエンドヌクレアーゼを有さないVDE intein、黒帯はGST標識、斜線はHis標識を示す。また、格子模様はリンカーを、stop は翻訳停止コドンを示し、start は翻訳開始コドンを意味する。

図5は、この発明の実施例において、蛋白質CaMと蛋白質M13の相互作用によるスプライシング結果を示した図である。(a)はpET__NVCΔSD (C/M) (SDS-PAGE)、(b)はpET__NVCΔSD (M/C)、(c)はpET__NVCΔSD (／) gene 1、(d)はpET__NVCΔSD linker (C

／M)、(e)はpET_NVCΔSDlinker(M／C)、(f)はpET_NVCΔSDlinker(／)を示し、(A)はanti-His標識によるウェスタンブロッティング、(B)はanti-GFPによるウェスタンブロッティングの結果を示す。

図6は、この発明の実施例において作成された各プラスミド(蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ①)を有する大腸菌からの粗生成物の蛍光スペクトルを示した図である(励起:470nm、5.0nmバンド幅、発光:5.0nmバンド幅)。(a)はNVCΔSDlinker(／)、(b)はNVCΔSD(C／M)、(c)はNVCΔSDlinker(C／M)を示す。

図7は、この出願の発明の実施例において用いられるプラスミドの構成を示した図である。点線は細胞内リボソーム結合サイト(IRES)を示す。また、pLucA11、pLucN、およびpLucCのcDNAはpcDNA3.1(+)に挿入されている。StopおよびStartは翻訳の停止および開始コドンを表す。

図8は、この出願の発明の実施例において、LucNのみ、LucCのみ、およびLucA11の発光強度を示す図である。

図9は、この出願の発明の実施例におけるインシュリン添加による蛋白質スプライシングの増加を示した図である。

図10は、この出願の発明の実施例におけるアミノ酸変異の影響を示す図である。

図11は、この出願の発明の実施例におけるLucF発光強度のインシュリン濃度依存性を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブは、各

プローブを連結させた二つの蛋白質が相互作用することによってスプライシングが起こり、プローブ中に含まれる分割された標識蛋白部位が連結して標識蛋白を再生し、シグナルを発するという原理に基づくものである。

蛋白質スプライシングとは、翻訳後の蛋白質から内部蛋白セグメント (intein) が切り出されるプロセスである。このとき、intein の切り出しと同時にフランキング配列 (extein) の連結も生じる (Gimble, F. S., *Sci. Biol.* 1998, 5, R251-256)。

この出願の発明の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブは、このような intein の自己切り出しを巧妙に応用することにより、蛋白質間の相互作用を解析するものである。

つまり、この出願の発明の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブは、2つの蛋白質に各々連結される2つのプローブ a、b からなるものである。図1にこの出願の発明の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブの原理を表す概略模式図を示した。

2つのプローブ a (1 a) およびプローブ b (1 b) において、プローブ a (1 a) は、intein の N-末端側のポリペプチド (2 a) と標識蛋白の N-末端側のポリペプチド (3 a) を含むものであり、プローブ b (1 b) は、intein の C-末端側のポリペプチド (2 b) と標識蛋白の C-末端側のポリペプチド (3 b) を含むものである。

これらのプローブ a (1 a) および b (1 b) を、各々相互作用を解析したい蛋白質 A (4 a) および B (4 b) に連結することにより、蛋白質 A-B 間の相互作用が解析される。すなわち、プローブ a (1 a) およびプローブ b (1 b) を連結した蛋白質 A (4 a) と蛋白質 B (4 b) が共存 (1) するとき、これらの蛋白質 (4 a、

4 b) が相互作用 (II) すれば、intein (2) がスプライシング (III) によって切り出される。これにより intein (2) に結合されている標識蛋白部位 (3 a、b) が連結される (IV) ので、得られた標識蛋白 (3) を解析すれば、蛋白質-蛋白質相互作用を確認することができるのである。

このとき、蛋白質 A (4 a) と蛋白質 B (4 b) が相互作用 (II) しなければ、intein のスプライシング (III) が起こらないため、標識蛋白 (3) は再生 (IV) されず、検出することができない。

この出願の発明の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブでは、各プローブ a、b (1 a、1 b) は、intein のポリペプチドと標識蛋白のポリペプチドのみからなるものであってもよいが、これら以外に、リンカー配列等を含んでいてもよい。したがって、プローブ a、b (1 a、1 b) において intein のポリペプチド (2 a、2 b) と標識蛋白のポリペプチド (3 a、3 b) は、直接結合されていてもよいし、リンカー配列などのポリペプチドを介して結合されていてもよいのである。

また、このような intein としては、種々の生物由来の公知のものが適用できる。例えば、*Saccharomyces cerevisiae* (酵母) S c e VMA、*Candida tropicalis* (カンジタ菌) C t r VMAなどに代表される真核生物由来のもの、*Mycobacterium tuberculosis* (結核菌) M t u r e c Aなどの真正細菌由来のもの、*Thermoplasma acidophilum* (サーモプラスマアシドフィラム) T a c VMAなどの古細菌由来のもの等が挙げられる。また、*Cyanobacterium synechocystis* sp. (藍藻) 由来の D n a E も intein として例示される。

この出願の発明の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ (1 a、

1 b) において、蛋白質 A (4 a) と蛋白質 B (4 b) の間に相互作用があるとき、intein が自動的に切り出されるためには、intein は、部位特異的エンドヌクレアーゼであることが好ましい。

具体的には、酵母 VMA 由来の intein や藍藻由来の Ssp D n a E intein が好ましく例示される。酵母 VMA では、新生翻訳生成物である 120 kDa VMA 1 が蛋白質スプライシングを触媒し、70 kDa の H⁺-ATPase サブユニットと、50 kDa の部位特異的エンドヌクレアーゼ (VDE、または P I - S c e l) を与える。この VDE は、上記蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ (1 a、1 b) における intein 部位 (2 a、2 b) として好ましく用いられる。また、藍藻由来の Ssp D n a E では、strain P C C 6 8 0 3 が、その DNA 配列が明らかになっている (N-末端側に 123 アミノ酸残基、C-末端側に 36 アミノ酸残基を有する) 上、天然の分割 intein であり、N-および C-extein の結合を起こすことが知られている (Wu, H., Hu, Z., Liu, X.-Q., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 9226-9231) ため、扱い易く、上記蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ (1 a、1 b) における intein 部位 (2 a、2 b) として好ましく用いられる。

以上に例示される種々の intein の中でも藍藻由来の Ssp D n a E intein が、哺乳動物細胞における蛋白質-蛋白質間の相互作用をも感度高く検出でき、好ましい。もちろん、これ以外の、公知あるいは新規の intein を用いてもよい。

さらに、この出願の発明の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ (1 a、1 b) では、intein のスプライシング (III) が有効に起こるためには、蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ 1 a と 1 b において、蛋白質のスプライシングに関与する二つの部位が隣接

するように、正しく折り畳まれ、かつ、各部位が正確に並べられなければならない (Duan, X., Gimble, F. S. and Quioco, F. A., *Cell* 1997, 89, 555-564)。したがって、intein としては、生物由来のものをそのまま用いてもよいが、一部のアミノ酸残基を変換したり、削除したり、適当なリンカー配列を導入したりして、スプライシングが起こりやすいように設計してもよい。

例えば前記の V D E では、エンドヌクレアーゼドメインを削除し、屈曲性のドデカペプチドリッカーで置き換えた変異体において、高いスプライシング活性を示すことが知られている (Cooper, A. A., Chen, Y. J., Lindorfer, M. A., Stevens, T. H., *EMBO J.* 1993, 12, 2575-2583; Chong, S., Xu, M.-Q., *J. Biol. Chem.* 1997 272, 15587-15590)。一方、藍藻 Ssp D n a E では、前記のとおり、天然の開裂 intein であり、正しく折りたたまれてスプライシングが起こることが知られているが、とくにリンカー配列を導入してもしなくてもよい。

以上のとおりの intein は、N-末端側のポリペプチド (2 a) と C-末端側のポリペプチド (2 b) に分割される。この出願の発明の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ (1 a、1 b) では、分割されたポリペプチド (2 a、2 b) は、標識蛋白の N-末端側のポリペプチド (3 a)、および C-末端側のポリペプチド (3 b) に各々結合されてプローブとなる。

一方、この出願の発明の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ (1 a、1 b) において、用いられる標識蛋白部位は、蛋白質 A および B の相互作用 (II) により、各プローブ a、b (1 a、1 b) から intein がスプライシング (III) したとき、直接ペプチド結合し、連結 (IV) されるものである。このような標識蛋白 (3) は、

連結 (IV) により再び解析可能となるものであれば、どのようなものであってもよい。例えば、蛍光蛋白や発光触媒酵素が好ましく適用される。緑色蛍光蛋白 (GFP) などの蛍光蛋白は、連結されたとき発光し、可視的に解析でき、好ましい。また、ルシフェラーゼ等の発光触媒酵素も連結されて活性中心を形成し、ルミノメーターで容易に検出可能な光を発するため、好ましい。このとき、分割されたルシフェラーゼの N-および C-末端が、夫々個々では蛍光を示さず、結合して再び活性を取り戻すようにするためには、活性中心を 2 つに分割するような分け方をする必要がある。ルシフェラーゼ酵素は、活性中心を含む広い間隔を挟んで、一つの β -バレルと二つの β -シートからなる大きな N-末端ドメインと C-末端部位の二つのドメインに折り畳まれていることが知られている (Waud, J. P., Sala-Newby, G. B., Matthews, S. B., Campbell, A. K., *Biochim. Biophys. Acta* 1996, 1292, 89-98; Conti, E., Franks, N. P., Brick, P., *Structure* 1996, 4, 287-298)。したがって、これらの二つのドメインが連結している柔軟な部位で分割して、3 a および 3 b とするとよい。さらに、ルシフェラーゼ酵素では、N-末端側のポリペプチド (3 a) に、intein の N-末端側のポリペプチド (2 a) との結合部位に、システイン (Cys) 残基、その -1 上流側にチロシン (Tyr) 残基、または -3、-4 位に各々アラニン (Ala) とフェニルアラニン (Phe) を有することにより、さらに効率的なスプライシングが起こり易くなることが知られていることから、437 番目のアルギニン残基をシステインに変換した変異体 (R437C)、436 番目のアスパラギン酸残基をチロシンに変換した変異体 (D436Y)、434 番目のイソロイシン残基をアラニンに変換した変異体 (I434A) 等の変異体を作成

し、効率的なスプライシングが起こるようにしてもよい。

この出願の発明では、以上のとおりの蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブが提供される。そして、一方のプローブ（例えばプローブ a）を相互作用を確かめたい一方の蛋白質（蛋白質 A）に連結させ、もう一方のプローブ（プローブ b）を相互作用を確認したいもう一方の蛋白質（蛋白質 B）に連結して両者を共存させることにより、以上のとおりの原理、機構に基づき、蛋白質 A-B間の相互作用が解析できるのである。

各蛋白質（4 a、4 b）とプローブ（1 a、1 b）の連結方法は、蛋白質やプローブに影響を及ぼさなければ、どのような方法であってもよい。例えば、通常用いられる化学的、生物化学的、あるいは、遺伝子工学的手法等が適用できる。

また、以上のとおりの蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを用いて蛋白質-蛋白質間の相互作用（発光）を検出、解析する方法は、どのようなものであってもよい。一般的に化学、生物化学等の分野で用いられる実験的手法や検出器を適用すればよく、例えばルミノメーター等を用いて簡便に検出、解析できる。

以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

実施例

実施例 1 蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ①の作成

蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ①の intein 部位としては、酵母 VMA 1 由来の intein (VDE) を用いた。

以下、VDEの454のアミノ酸のうち、Cys1を最初のアミノ酸残基、Asn454を最後のアミノ酸残基とする。また、C_{extein}は、Cys455から開始し、Cys1に隣接した extein 残基を-1とナンバリングする。以下N-extein 方向に-2、-3・・・と数字が大きくなる。

標識部位としては、発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来の緑色蛍光蛋白 (EGFP: 例えば *Current Biology* 1996, 6(2); 178-182) を用いた。

蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ①では、スプライシング結合部としては、EGFPのN-末端側のポリペプチドに1つのCys残基、-1位の上流にあるGly残基、-5、-4、-3の3つの疎水性アミノ酸残基が存在することが必要である。

したがって、EGFPのN-末端側のポリペプチドの構造が比較的安定な1124~1129の間でアミノ酸残基を以下のように置換した(図2)。

(1)EGFPの1129CおよびE125Iの変異を行なった。これらは蛍光を呈し、EGFPのそれと同等の488nmおよび510nmに励起および発光ピークを示した。

(2)さらにm125にL126Yの変異を行なった場合には、発現レベルが同じであるにもかかわらず、蛍光が見られなくなった。

以上より、L126Yの変異によりm129EGFP変異体が不正に折り畳まれるようになったこと、および/または、蛍光蛋白部位が連結できないことが示された。

そこで、1129CおよびE125Iの変異を行ったm125EGFP変異体を蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブの標識蛋白部位として用いた。以下、この標識蛋白部位をEGFP変異体と呼

ぶ。

実施例2 単一ポリペプチドにおけるスプライシングの確認

VDEがEGFP変異体のN-末端側ポリペプチドおよびC-末端側ポリペプチドに挟まれた単一のポリペプチドにおいて、蛋白質スプライシングが生じるかを確認するために、大腸菌中でpGEX-NVCの発現を25℃で行なった。

(1) 大腸菌のDH5 α 株を用いてグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合蛋白を発現した。VDE領域とEGFP変異体のN-およびC-末端側ポリペプチドを覆うプラスミドをtacプロモーターの制御下で、このGST遺伝子に融合した。これより、GST(26-kDa)、EGFP変異体のN-末端側ポリペプチドから125残基(13-kDa)、VDE(50-kDa)、および変異体のC-末端側ポリペプチド(14-kDa)からなるキメラ蛋白質が得られた。

(2) 得られた蛋白質を大腸菌から抽出、精製し、SDS-PAGEによって同定した。12~15%SDS-PAGEゲル上に、標識蛋白と10~225-kDa(Novagen)を添加し、電気泳動を行なった。ゲルをCoomassie Brilliant Blue染色し、可視化した。

ウェスタンブロッティングは、anti-VDEポリクローナル抗体、anti-His標識ポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology)、またはanti-GFPモノクローナル抗体(BioRad)をプローブとして行なった。

クローニングに必要な酵素は、すべてTakara Biomedicalから入手し、製造元のマニュアルに従って用いた。

PCR断片は、ABI310ジェネティックアナライザーによっ

でシーケンスされた。

粗生成物の主成分は、 $\sim 50\text{-kDa}$ の蛋白質であった(図3b)。これは、VDE (50-kDa) およびGSTと連結した extein の大きさと一致した。つまり、GSTとEGFP変異体のN-末端側ポリペプチド ($26\text{-kDa} + 13\text{-kDa}$) の融合蛋白質であると考えられる。

これより、融合蛋白質の 103-kDa 前駆体が 50-kDa のVDEと 53-kDa のGST-EGFP変異融合蛋白質に分割されたことが分かった。

さらに、VDEとGST-EGFP変異融合蛋白質の分子量を、ウェスタンブロッティングより評価した。

Anti-VDEおよびanti-GFP抗体は、それぞれ、切り出された 50-kDa intein (図3d) および 53-kDa GST-EGFP変異融合蛋白(図3e)と特異的に反応した。また、スプライシングされない前駆体の 100-kDa 付近に見られる成分は、いずれの抗体によっても解析された。

GST-アフィニティーカラムによってさらにGST-EGFP変異融合蛋白の同定を行なった。粗生成物をアフィニティーカラムに通し、樹脂に結合した蛋白質をPreScissionプロテアーゼで取り出し、SDS-PAGEにかけた(図3c)ところ、 25-kDa にバンドが見られた。これは、EGFP変異体の分子量とほぼ一致した。

(3) 次にアフィニティーカラムによって精製された蛋白質の蛍光スペクトルを測定したところ、励起および発光の最大波長は、それぞれ 488nm および 510nm となり、EGFPの値とよく一致した。

以上の結果より、スプライシングによって単一ポリペプチドの中央にあったVDEが切り出され、EGFP変異体のN-およびC-末端のポリペプチドがペプチド結合によって連結し、得られたEGFP変異体が正しく折りたたまれて蛍光体となることが示された。

実施例3 蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ①の有効性

(1) 大腸菌BL21(DE3) pLysS株を用いてN-末端にHis標識を結合した組換え融合蛋白質を得た。

蛋白質-蛋白質相互作用を試験するために、pGEX__NVCのGSTをpET16-bベクターのHis標識で置換し、スプライシングの機能部位を分割してpET__NVCΔSD(／)を得た。

この分割は、185～389アミノ酸領域に存在する機能的に不要なエンドヌクレアーゼモチーフを((翻訳停止コドン) - (Shine-Dalgarno配列) - (翻訳開始コドン))からなるカセットで置換することにより実現した。

得られたプラスミドpET__NVCΔSD(／)は、主にEGFPとVDEのN-末端側のポリペプチド(N__EGFP-VDE)をコードするgene1と、VDEとEGFPのC-末端側のポリペプチド(C__VDE-EGFP)をコードするgene2からなる2遺伝子オペロンであった。

蛋白質-蛋白質相互作用の際に、VDEのN-およびC-末端側のポリペプチドが空間的に近位にあるようにするために、図4に示されるように、翻訳停止コドンと翻訳開始コドンの間にGly-Aasn繰り返し配列を有する屈曲性のペプチドリンカーを導入した(pET__NVCΔSDlinker(／))。

大腸菌内においてEGFPを与えるスプライシング現象を容易に起こすような特別な蛋白質-蛋白質相互作用が存在するかを確認す

るために、カルモジュリン (CaM) とそのターゲットペプチドである M13 をモデル蛋白質として選択した。

CaM および M13 の構造は、NMR により明らかになっている (Ikura, M. et al. *Science* 1992, 256, 632-638) ため、CaM 中の任意のアミノ酸から M13 中の任意のアミノ酸までの距離が分り、好ましい。

(2) 組換えプラスミド pET_NVCΔSD (C/M)、pET_NVCΔSD linker (C/M)、および pET_NVCΔSD linker (／) を大腸菌細胞内に導入し、対応する融合蛋白質を得た。

菌内でスプライシングを起こすために、蛋白発現を 25℃ にて 12 時間行い、その後 4℃ で 1～2 日間保存した。

gene1 の発現蛋白は、anti-His 標識抗体によって確認された (図 5A)。また、抗体によって解析された主成分は、55-kDa 蛋白 (図 5Aa、d) であり、これらは N_EGFP-VDE (36-kDa) のスプライシングされない前駆体と CaM (17-kDa)、または、その連結リンカー (1-kDa) の大きさと同程度であった。

コントロールとして、pET_NVCΔSD linker (／) プラスミドを有する大腸菌の溶解産物を SDS-PAGE にかけたところ、N_EGFP-VDE の単一バンドが得られた (図 5Af)。

これら 3 種のプラスミドから得られたスプライシングされない前駆体蛋白質の発現レベルはほぼ同一であった。

一方、gene2 の蛋白質生成物は、anti-GFP モノクローナル抗体によって識別され、EGFP の C-末端側のポリペプチドであることが分かった。

さらに、 $pET_NVC\Delta SD$ (C/M) および $pET_NVC\Delta SD linker$ (C/M) を発現した細胞において、遺伝子オペロンから得られた発現蛋白の大きさは、 $N_VDE-EGFP$ (20-kDa) と $M13$ (3-kDa) (図5Ba) または含リンカー $M13$ (4-kDa) (図5Bd) の前駆体蛋白質のそれとよく一致した。同様に、コントロールプラスミドは、予想された蛋白質を発現した (図5Bf)。オペロン11から得られた3つの蛋白質は、いずれも同じ発現レベルであった。

図6に各プラスミドを保有する大腸菌溶解産物の蛍光スペクトルを示した。 $pET_NVC\Delta SD linker$ (/) を含む大腸菌では、スペクトル変化は見られなかった。 $pET_NVC\Delta SD$ (C/M) を有する大腸菌中で、CaMとM13を共発現したところ、510nmにおける蛍光発光に若干の変化が見られた。一方、 $N_EGFP-VDE$ および $C_VDE-EGFP$ に屈曲性のペプチドリンカーを結合したCaMおよびM13の共発現では、510nmの蛍光が大きく変化した。 $pET_NVC\Delta SD linker$ (C/M) を有する大腸菌からの粗生成物の蛍光強度は、コントロールプラスミド $pET_NVC\Delta SD linker$ (/) または屈曲性リンカー $pET_NVC\Delta SD linker$ (C/M) をコードしないプラスミドを有する細胞を識別するのに十分であった。

これらの結果より、CaMとM13の相互作用により、*in trans* でスプライシングが起こり、EGFP変異体のN-およびC-末端の二つの外部領域が連結してEGFP蛍光体を形成することが示された。

実施例4 蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ①におけるリンカーの効果

スプライシングが起こるためには、VDEにおけるN-およびC-末端が正しく折り畳まれなくてはならない。このような折り畳みは、C-末端のN__VDEがN-末端のC__VDEと近位にあるとき生じる。

CaMとM13の場合、CaMのN-末端およびM13のC-末端の間の距離は、50 Åであった (Brookhaven Protein Data Bank より)。この距離は、N__VDEおよびC__VDEが隣接するには大きすぎる可能性があり、したがって、pET__NVCΔSD linker (C/M) プラスミドを有する大腸菌での正しい折り畳みを阻害しているものと考えられた。

しかし、実際には、pET__NVCΔSD linker (C/M) プラスミドでの510 nmで蛍光強度の明らかな増大が見られ、N__およびC__VDEにそれぞれ結合した10-および9-アミノ酸リンカーがVDEの折り畳みに必要な屈曲性を持たせ、VDEが効率よくスプライシングするコンホメーションがとられていることが示された。

実施例5 蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ②の作成

以下、プラスミドの作成は、大腸菌の strain DH5α 株を宿主として行った。

蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ②の intein 部位としては、藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 株由来の DnaE を、標識蛋白としては、野生ホタル由来のルシフェラーゼ (Luc__F) (pLucA11) を437アミノ酸と438アミノ酸の間で分割し、N-末端側 (pLucN) およびC-末端側 (pLucC) として用いた。

図7にこれらのルシフェラーゼおよびルシフェラーゼ片の構成を

示した。

(1) ルシフェラーゼの分割

まず、pLucNおよびpLucCが酵素活性を失っていることを確認するために、ヒトインシュリンリセプターを過剰発現したチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-HIR)に各ルシフェラーゼ片を過渡的に発現させた。

1 μ gのプラスミド(pLucAII、pLucN、およびpLucC)と0.01 μ gのコントロールプラスミド(pRL-TK)とともにCHO-HIRにトランスフェクションし、12ウェルプレート中で45時間培養した。培養後、発光をルミノメーターで測定した。

また、コントロールとして、プラスミドを含まないCHO-HIRを同条件で培養した。

プレート中のウェル毎のトランスフェクション効率の誤差を補正するために、*Renilla* (ウミシイタケ) 由来のルシフェラーゼ(Lum_R)を用いた dual-ルシフェラーゼ アッセイを行い、ウェル毎のトランスフェクション効率を補正した。

図8に各ルシフェラーゼ(またはルシフェラーゼ片)の相対発光強度(RLU)を示した。

野生ホタルルシフェラーゼ(LucAII)を発現したCHO-HIRでは、RLUは、11.4であった(図8a)が、LucNおよびLucCのみを発現したCHO-HIRでは、RLUは、それぞれ 2.2×10^{-4} および 4.5×10^{-5} であった(図8b)。また、Lum_Rそのものを形質移入したCHO-HIRのRLU(バックグラウンド)は、 2.2×10^{-4} であったことから、LucNおよびLucCのみでは発光活性を有さないことが示された。

(2) DnaEの分割

藍藻 (*Synechocystis sp.*) PCC 6803 株由来の DnaE は、前記のとおり、N-末端側の 123 アミノ酸残基と C-末端側の 36 アミノ酸残基を用いた。

(3) 蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ②

上記(2)の DnaE の N-末端側と(1)の LucN を、また、上記(2)の DnaE の C-末端側と(1)の LucC を、各々連結し、バイストロン性発現ベクターである pIRES (Invitrogen) のマルチクローニングサイト (MCS) に挿入し、pIRES-DSL を得た。得られたプラスミド (pIRES-DSL) は、N-末端 DnaE の 3'-末端側と C-末端側 DnaE の 5'-末端に二つの MCS (各々、MCS-A および MCS-B) を有し、これらの MCS には、相互作用する、または相互作用を調べたい蛋白質や蛋白質ドメインを導入することができる。

図 7 に pIRES-DSL の構成を示した。

実施例 6 蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ②の有効性 1

(1) 実施例 5 で作成した蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ②が有効に作用し、ルシフェラーゼのスプライシングを起こすことを確認するために、生理学的にインシュリン情報伝達に関与することで知られる IRS-1 の 941 番目のチロシン残基を含むオリゴペプチド (Y941) およびそのターゲット蛋白であるホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ由来の SH2N ドメイン (White, M.F., *Diabetologia* 1997, 40, S2-S17) を用いた。

前記 MCS-A に Y941 を、MCS-B に SH2N を挿入した pIRES-DSL (Y/S) と pRL-TK ベクターを CHO-HIR に過渡的に共発現させた。

図7にpIRES-DSL (Y/S) の構成を示した。

まず、6ウェルプレート中で2 μ gのプラスミド (pIRES-DSL (Y/S)) および0.02 ngのコントロールプラスミド (pRL-TK) をCHO-HIR細胞にトランスフェクションした。45時間の培養後、培養液をFBSを含まない 1.0×10^{-7} Mのヒトインシュリン溶液で置換し、CHO-HIR細胞を72時間、3時間、および5分間培養 (37°C) して刺激した。5分間培養した細胞は、その後、インシュリン溶液をFCSフリーでインシュリンを含まない培養液で175分間培養した。

インシュリン刺激後のRLUによる発光強度を図9に示した。

CHO-HIR細胞がインシュリンにより72時間、3時間、および5分間刺激された際の補正後のルシフェラーゼ活性は、各々1.0、0.73、0.18であった。また、インシュリンを含まない培養液で培養した際の発光強度 (バックグラウンド) は、0.15であり、5分間インシュリン刺激を行った結果とほぼ同等であることが分かった。

さらに、3時間以上インシュリンによる刺激を行った際のRLUによる発光強度は、バックグラウンド値の4倍以上であることが示された。ここで見られたキナーゼ活性は、インシュリンレセプターによってリン酸化されたY941ペプチド (941番目のアミノ酸 = チロシン) とSH2Nの特異的な相互作用によるものであり、蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ②においてDnaEの*in trans*での折り畳みとスプライシングが効率的に起こり、LucNとLucCが連結してルシフェラーゼ発光が再現されたことが明らかとなった。

そこで、Y941におけるチロシン残基をインシュリンリセプタ

ーによってリン酸化されないアラニン残基に変換したY941変異体を作成し、同様の試験を行った。

結果を図10に示した。

Y941変異体を発現させたCHO-HIR細胞では、補正後のルシフェラーゼ発光はバックグランドと同程度であったことから、Y941のチロシンのリン酸化によりSH2Nと蛋白質間相互作用が起きたことが確認された。

実施例7 蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ②の有効性2

実施例5で作成された蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ②を用いてCHO-HIR細胞におけるインシュリン誘発蛋白質相互作用の定量的解析を行った。

まず、RLU値のインシュリン濃度依存性を確認した。CHO-HIRを前記のとおりにpIRES-DSL(Y/S)とpRL-TKで共発現した後、前記の方法で $1.0 \times 10^{-13} \sim 1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ の範囲の各濃度のインシュリンを用いて37℃で3時間刺激した。

RLUによる発光強度を図11に示した。

発光強度はインシュリン濃度に伴って増大することが確認された。

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、蛋白質-蛋白質相互作用を精度高く、かつ簡便に解析するための蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブが提供される。また、この蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを用いた蛋白質-蛋白質相互作用の解析方法が提供される。

この蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを用いた蛋白質-蛋

白質相互作用の解析方法では、従来の方法のようにレポーター遺伝子や基質を用いる必要がなく、簡便で精度高い解析が可能となる。また、哺乳動物細胞においても感度高く蛋白質-蛋白質相互作用を解析できる。

したがって、この発明の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを用いれば、細胞膜での蛋白質間の相互作用や細胞内におけるホルモンによるレセプターの活性化など、あらゆる生体内での蛋白質-蛋白質相互作用の機構を短時間で簡便に解析することが可能となる。

請求の範囲

1. 二つの蛋白質間の相互作用を解析するためのプローブであって、蛋白質-蛋白質相互作用によりプロテインスプライシングを生じさせ、物理化学的または生化学的に検出可能な蛋白質を再生させることを特徴とする蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ。
2. intein のN-末端側のポリペプチドと標識蛋白のN-末端側のポリペプチドを含むプローブaと、intein のC-末端側のポリペプチドと標識蛋白のC-末端側のポリペプチドを含むプローブbの二つのプローブからなる請求項1の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ。
3. プローブaのC-末端側とプローブbのN-末端側に、リンカー配列を有する請求項2の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ。
4. intein が酵母VMA由来のエンドヌクレアーゼである請求項2または3のいずれかの蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ。
5. intein が藍藻由来のDnaEである請求項2または3のいずれかの蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ。
6. 標識蛋白が蛍光蛋白である請求項2ないし5のいずれかの蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ。
7. 蛍光蛋白が緑色蛍光蛋白である請求項6の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ。
8. 標識蛋白が発光触媒酵素である請求項2ないし5のいずれかの蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ。

9. 発光触媒酵素がルシフェラーゼである請求項8の蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブ。
10. 請求項2ないし9記載のいずれかのプローブaを連結した蛋白質と請求項2ないし9記載のいずれかのプローブbを連結した蛋白質を共存させ、標識蛋白のシグナルを検出することを特徴とする蛋白質-蛋白質相互作用の解析方法。
11. 請求項1ないし9記載のいずれかの蛋白質-蛋白質相互作用解析用プローブを発現するポリヌクレオチドを真核細胞内に導入することによりプローブaを連結した蛋白質とプローブbを連結した蛋白質を共存させる請求項10の蛋白質-蛋白質相互作用の解析方法。

図 1

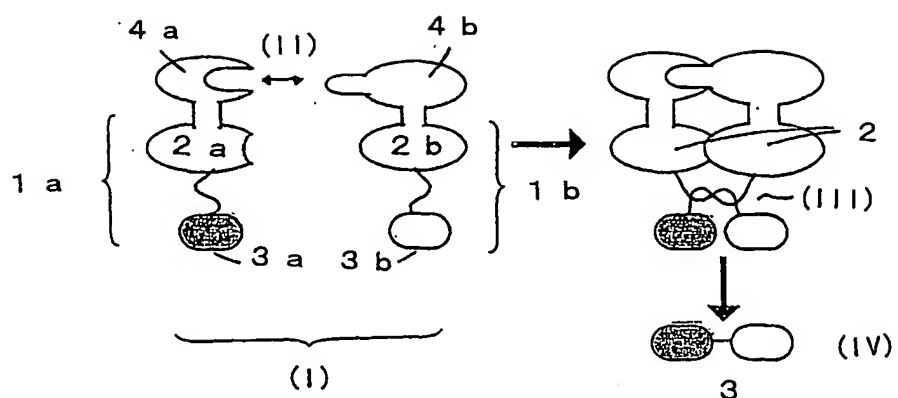
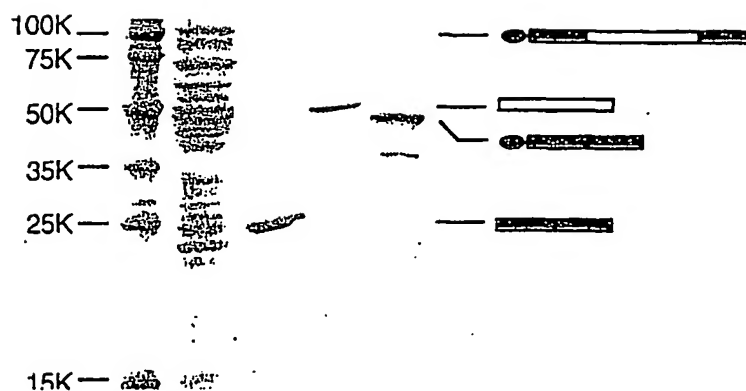


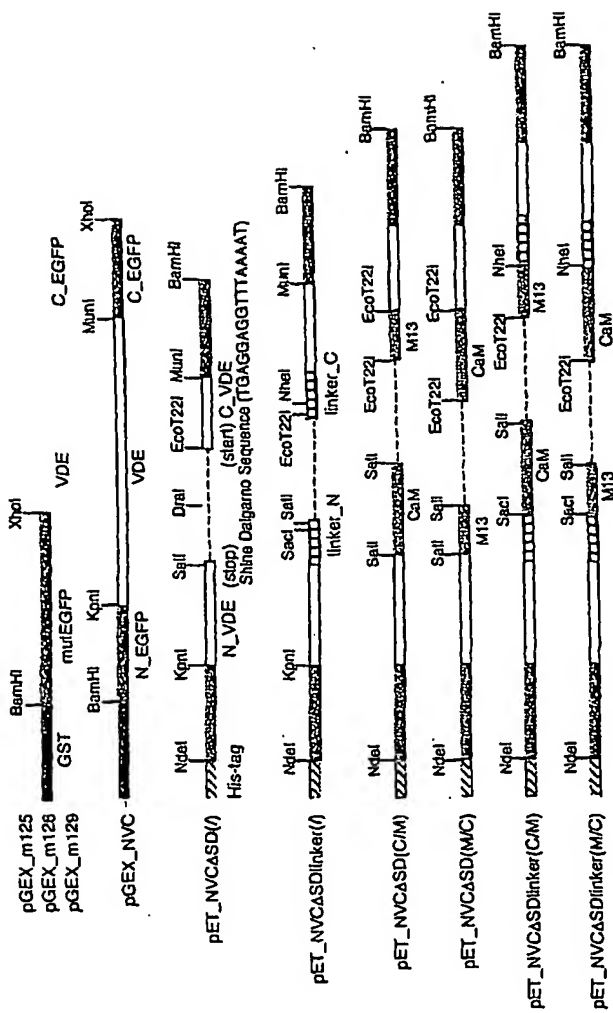
図 2

	VDE	-----	⁴⁵⁰ VV	⁴⁵⁵ HNC
	EGFP	-----	I EL K G I	-----
			₁₂₄ * *	_{*129}
m125 :	E125I, I129C		I I L K G C	
m126 :	E125I, L126Y, I129C		I I Y K G C	
m129 :	I129C		I E L K G C	

図 3



4



linker_N : GCG ATC AAC AAC GGT AAC GGC CGT AAC GGT (ASNNNGRNG)
 linker_C : GGC AAC AAC GGT GGC AAC AAC GAC GTA (GNNGGNNDV)

図 5

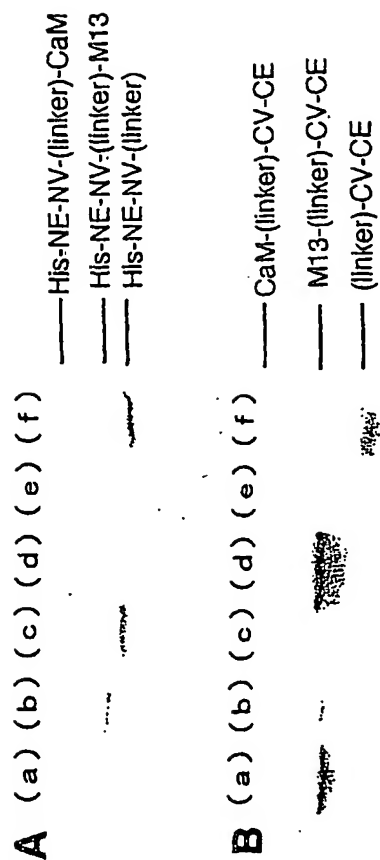
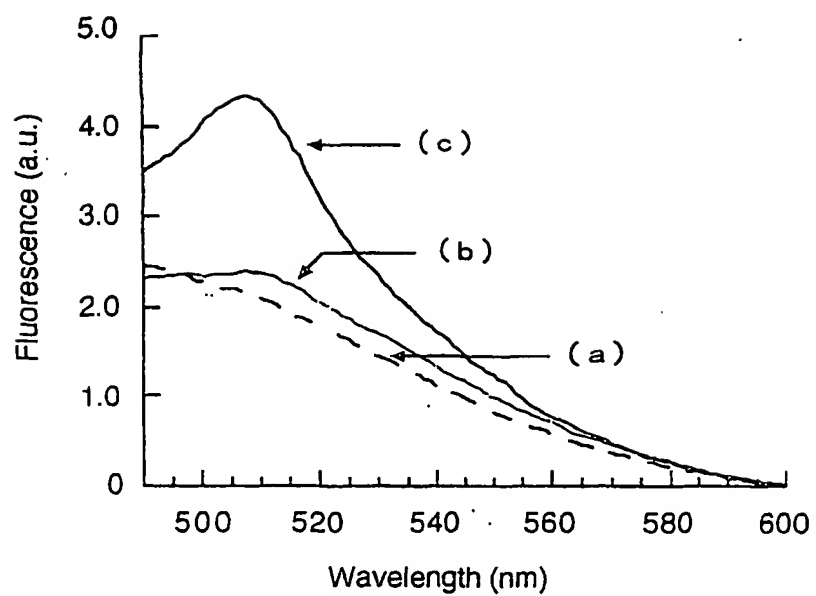
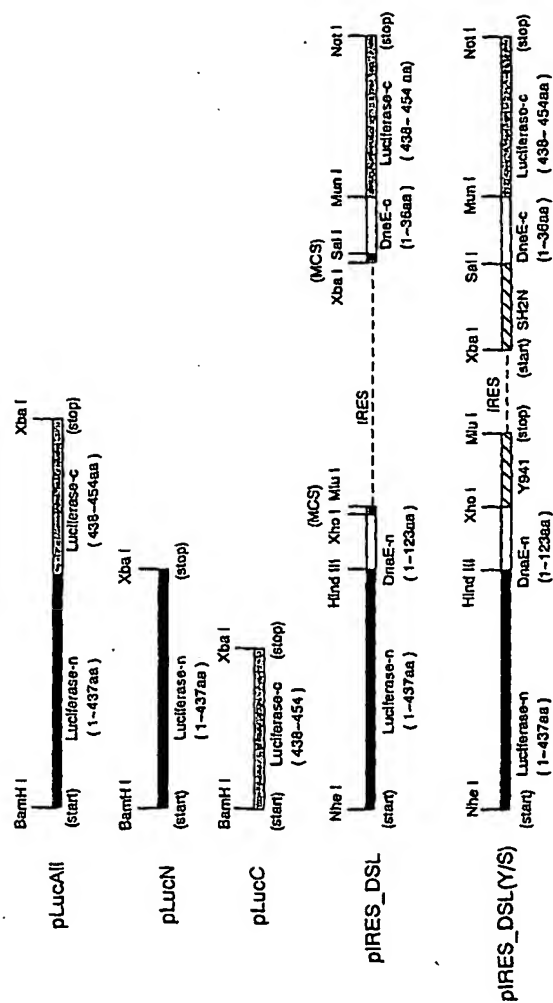


図 6



7



Y941 peptide : TEEAYMKMDLQPG

図 8

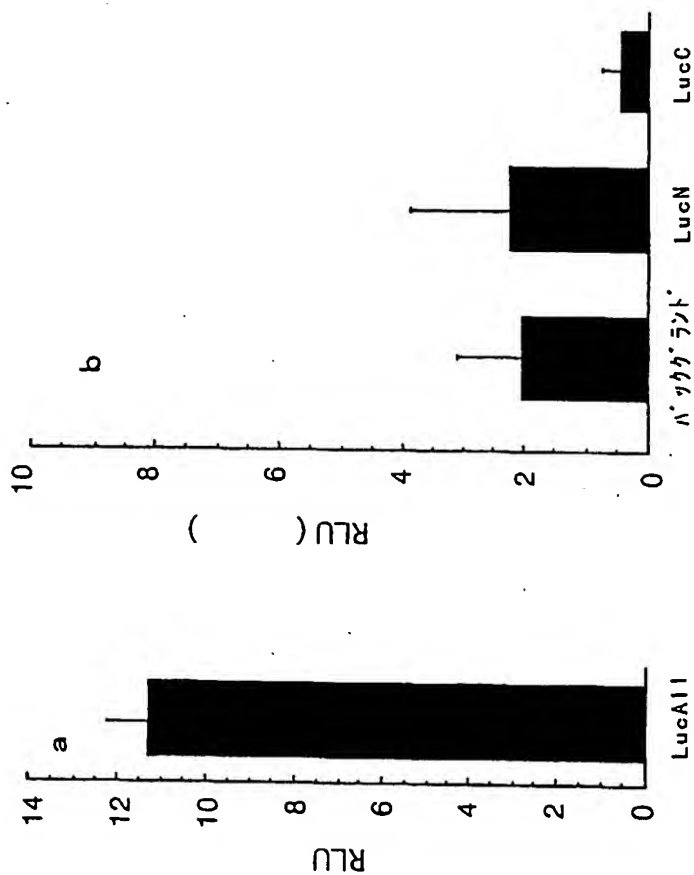
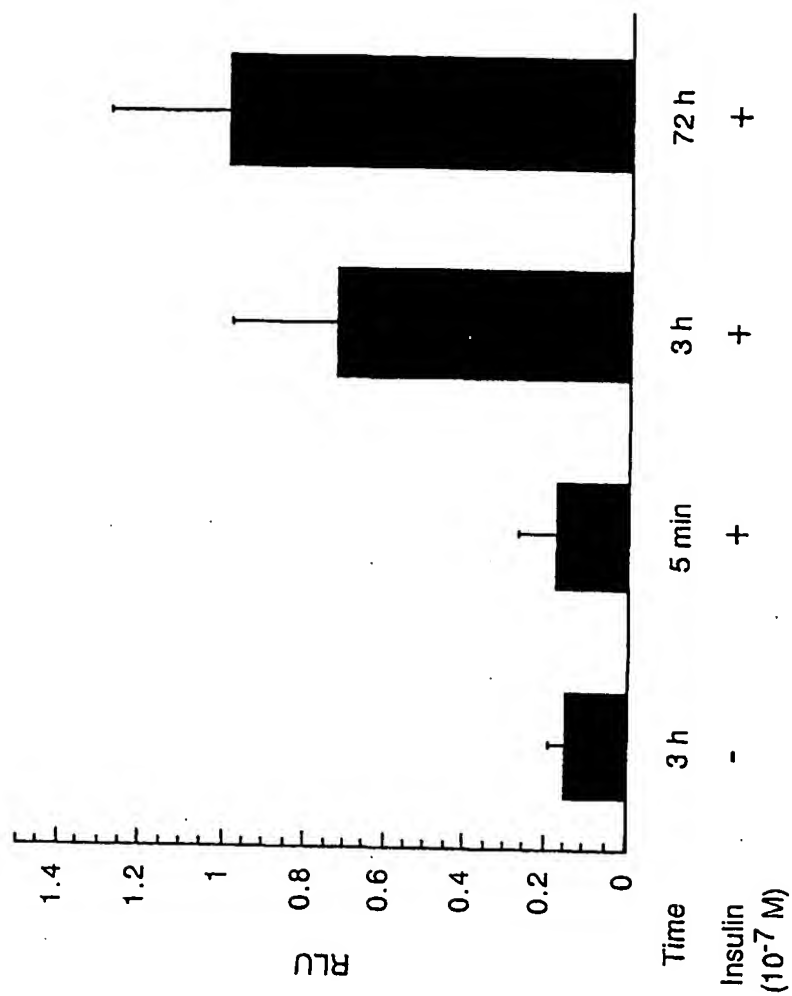
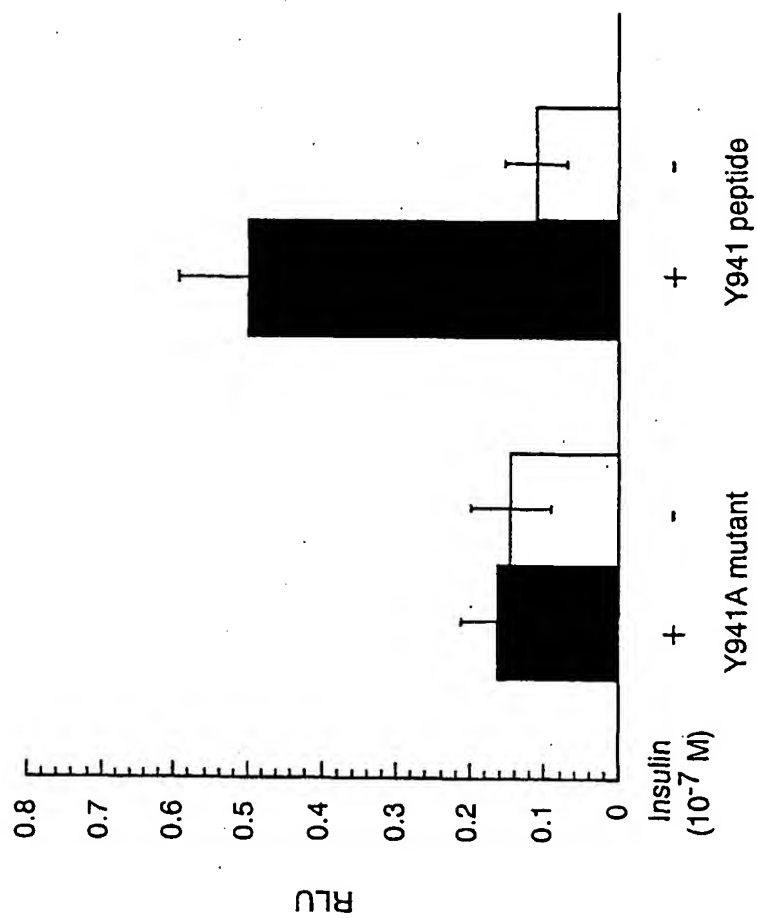


図 9

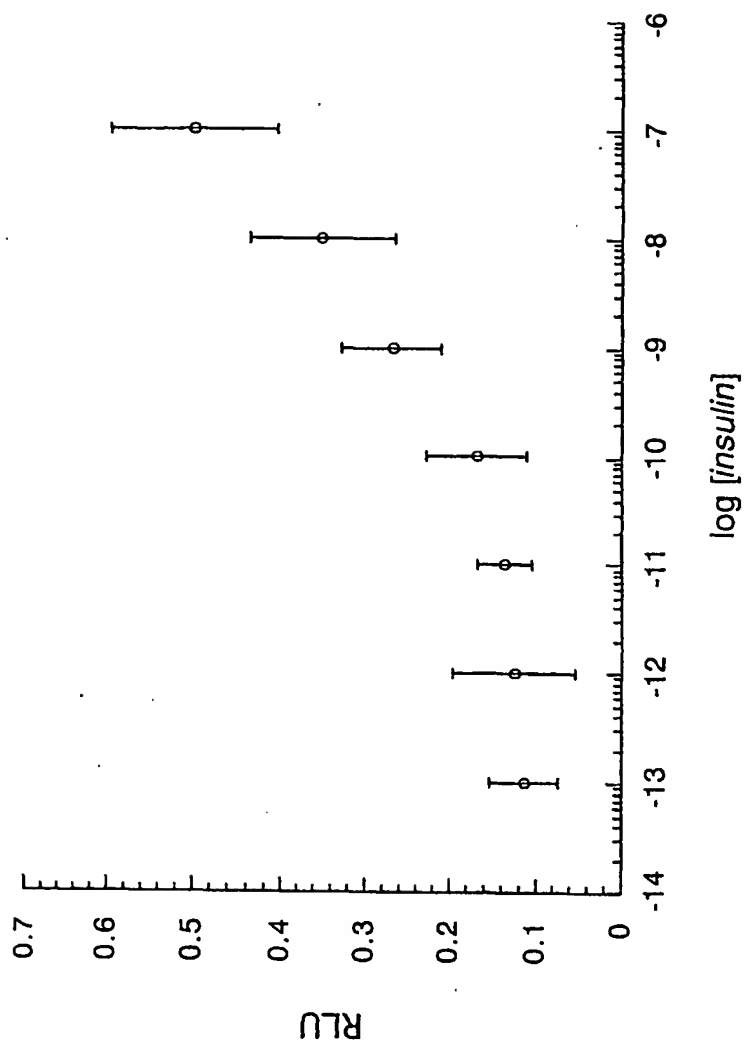


10



10/11

11



11/11